

Paris 1968

O R S A Y

Série A.

N° d'ordre : 319

Sujet de la Thèse

Synthèse de dérivés asymétriques du tréhalose
et étude de la spécificité de la tréhalase de
hannetons à l'aide de ces dérivés.

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de Doctorat ès
Sciences enregistrée au C.N.R.S. sous le numéro
A O 2177

par

Melle GUILLOUX Edith Renée

Soutenue le 29 mars 1968 à la Faculté des
Sciences d'Orsay

devant le jury :

MM. E. LEDERER, Président

R. DEDONDER	} Examineurs
J.E. COURTOIS	



ÉTUDE D'UNE TRÉHALASE PURIFIÉE EXTRAITE DU HANNETON (*MELOLONTHA VULGARIS*) (*).

par E. GUILLOUX, J. E. COURTOIS et F. PERCHERON (**).

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Pharmacie Paris (6°).

(Mémoire reçu le 3 juillet 1968).

Résumé. — A partir d'un broyat de hannetons, les auteurs ont réalisé la purification d'une tréhalase, par précipitation fractionnée avec le sulfate d'ammonium (0-70 p. 100) suivie de chromatographie sur colonne d'alumine. La stabilisation de l'enzyme est assurée par une lyophilisation en milieu tamponné, dès l'élution de la colonne. Cette tréhalase, dont le poids moléculaire est voisin de 100 000, n'est pas une glycoprotéine, l'activité biologique nécessite la présence d'au moins un groupe SH dans la protéine enzymatique.

Le pH optimum se situe à 6,25 et à ce pH, $K_m = 6.10^{-4}$ M à 37°.

La tréhalase ne se comporte pas comme une α glucosidase habituelle, car elle n'hydrolyse ni les α -D-glucosides, ni les xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4') xylopyranosides, ni les dérivés non symétriques du tréhalose. Son seul substrat spécifique semble être l' α , α -tréhalose et les hydroxyles en position 3 et 6 sont indispensables pour que la tréhalase exerce son action hydrolysante.

Elle n'est pas inhibée par les métabolites de la chaîne glycolytique, ni par les dérivés phosphorylés de l'adénosine.

L'action inhibitrice de différents cations a été étudiée et aucune activité transférante de cette tréhalase n'a pu être mise en évidence.

Les tréhalases (α , α' -glucoside 1-glucohydrolase, E.C.3.2.1.28) sont des enzymes qui agissent spécifiquement sur le tréhalose, disaccharide non réducteur, pour le scinder en deux molécules de glucose. Elles sont très largement distribuées dans la nature et paraissent jouer un rôle important chez les Insectes où le tréhalose représente le principal saccharide sanguin et sert de source d'énergie en particulier lors du vol.

Les premières recherches concernant les tréhalases ont été faites avec des préparations non purifiées, ce qui a laissé supposer que les tréhalases pouvaient admettre comme substrat, en dehors du tréhalose, le tréhalose substitué sur l'une de ses deux fonctions alcool primaire (par un ester phosphorique ou méthanesulfonique). Cependant l'utilisation de prépara-

(*) Ce travail représente une partie de la thèse de Doctorat ès-Sciences d'état soutenue par E. GUILLOUX, le 29 mars 1968 (Faculté des Sciences d'Orsay).

(**) Travail réalisé avec l'aide du CNRS dans le cadre de l'Equipe de Recherche Associée n° 99.

tions enzymatiques purifiées a montré que seul l' α,α -tréhalose est hydrolysé par les tréhalases. De plus, tous les essais de transfert [1, 2, 3] avec ces enzymes ont échoué.

Ce manque d'activité transférante, quoique observé chez plusieurs polysaccharidases est un phénomène inhabituel chez les oligosidases — qui en général sont douées d'une activité réversible. Le produit d'une telle réaction de transfert devrait être lui-même un substrat pour l'enzyme. C'est pourquoi il nous a paru souhaitable d'examiner le comportement d'une tréhalase purifiée vis-à-vis de dérivés dissymétriques du tréhalose.

Diverses tréhalases ont déjà été purifiées [1, 3-9].

Dans le présent travail nous décrivons la purification et l'étude de quelques propriétés de la tréhalase de Hanneton ; en particulier, son comportement vis-à-vis de substrats nouveaux que nous avons préparés.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

a) *Substrats utilisés.*

— Le tréhalose provient des établissements Prolabo ou Merck. Avant de l'utiliser nous avons vérifié son pouvoir rotatoire, sa pureté à la chromatographie dans différents solvants et son absence de pouvoir réducteur.

— Le phényl α -D-galactopyranoside a été préparé suivant la méthode d'HELFERICH et SCHMITZ-HILLEBRECHT [10], le phényl β -D-galactopyranoside suivant la méthode d'HELFERICH [11], le phényl α -D-glucopyranoside suivant celle de MONTGOMERY, RICHTMYER et HUDSON [12]. Le phényl β -D-glucopyranoside est un sous-produit de la préparation précédente. Nous l'avons également synthétisé par la méthode d'HELFERICH [11].

— Préparation des phényl-D-mannopyranosides α et β .

a) Préparation du penta-O-acétyl β -D-mannopyranoside par la méthode d'HUDSON et DALE [13].

b) Préparation des phényl tétra-O-acétyl D-mannopyranosides α et β suivant la technique d'HELFERICH et WINKLER [14].

c) Désacétylation par le méthylate de sodium, selon ZEMPLÉN [15].

b) *Mesure de l'activité hydrolytique.*

— Composition du milieu réactionnel :

1 ml de solution enzymatique

1 ml de substrat 0,025 M

0,5 ml tampon Mc Ilvaine dilué au 1/2.

La réaction est arrêtée par introduction d'une partie aliquote dans 2 ml de réactif cupro-alcalin de SOMOGYI. Les saccharides réducteurs sont dosés par la technique réductimétrique de NELSON-SOMOGYI [16, 17].

Des expériences témoins avec l'enzyme inactivé par la chaleur sont effectuées simultanément.

c) *Dosage des protéines.*

Elles sont dosées à la sortie des colonnes par absorption dans l'UV à 280 nm. Dans tous les autres cas, elles sont dosées par la technique de LOWRY [18] avec la sérumbumine de bœuf comme étalon. L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en unités internationales $\mu\text{mol}/\text{mn}/\text{mg}$ (protéine).

d) Toutes les étapes de la purification enzymatique s'effectuent à $+ 4^{\circ}\text{C}$.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1) *Purification de l'enzyme.*

a) *Préparation d'un extrait brut.*

Les insectes adultes (*Melolontha vulgaris*, Coléoptères) ont été récoltés soit en juillet 1961, soit en juillet 1964, dans la région parisienne (Orly) et congelés à -20°C . 50 g de hannetons sont lavés dans un tampon Mc Ilvaine de pH 6,5 puis broyés 2 mn au turmix en présence de 250 ml du même tampon à $+ 4^{\circ}\text{C}$. Nous transvasons dans un flacon d'un litre, rinçons le bol broyeur avec 50 ml de tampon et soumettons le flacon à une agitation mécanique pendant 12 heures. Après une centrifugation de 6 000 tours/mn, pendant 20 minutes, nous dialysons contre de l'eau distillée, puis centrifugeons à 20 000 tours pendant 1/2 heure.

b) *Précipitation par le sulfate d'ammonium.*

Une étude préliminaire nous a montré que les fractions précipitées entre 0-30 p. 100, 30-40 p. 100 et 40-70 p. 100 ont des activités osidasiques analogues. Nous précipitons donc directement de 0 à 70 p. 100 de saturation. Le culot repris par de l'eau distillée après dialyse nous sert pour les essais ultérieurs de purification ; 50 ml de cette préparation qui peut être conservée à -20° , correspondent à 75 g de hannetons.

c) *Chromatographie sur colonne d'alumine.*

Nous n'avons pu obtenir aucune séparation sur DEAE-cellulose, sur phosphate de cellulose, ni sur Sephadex G 100 ou G 200. La chromatographie sur colonne d'alumine préconisée par PETEK et DONG [19] et déjà utilisée par ZANOZI [20] consiste en une précipitation de l'enzyme sur la colonne à un pH où il est insoluble. La précipitation est suivie d'une élution par un tampon de pH supérieur qui le solubilise.

Pour la tréhalase de Hanneton, et la plupart des enzymes associés, ce pH est de 3,8 : en effet, si nous dialysons la préparation 0-70 p. 100 contre un tampon de Mc Ilvaine de pH 3,8, il se forme un précipité qui renferme la majeure partie de l'activité tréhalasique et que l'on peut redissoudre dans l'eau. A pH 4,2, il n'y a pas de précipitation de la tréhalase.

Préparation de la colonne.

Nous lavons soigneusement 500 g d'alumine Merck par décantations successives avec 10 litres d'eau distillée jusqu'à ce que nous ayons éliminé

les fines particules en suspension et que le pH des eaux de lavage, initialement à 9 soit descendu à 5. Nous lavons ensuite avec du tampon de Mc Ilvaine 0,2 M pH 3,8 à travers la colonne à la vitesse de 0,5 ml par minute pendant 24 heures à la chambre froide à $+4^{\circ}$. Nous vérifions que le pH de sortie du tampon est bien 3,8. La colonne d'alumine atteint 40 cm de hauteur. Nous introduisons 20 ml de la préparation 0-70 p. 100 dialysée contre de l'eau distillée. Après absorption totale, nous éluons avec 4 litres de tampon pH 3,8 puis avec du tampon 4,4. Les fractions éluées sont recueillies dans les tubes d'un collecteur de fractions et leur teneur en protéines est estimée par mesure de leur absorption ultra-violetle à 280 nm.

Les protéines du pic sorti à pH 3,8 possèdent de faibles activités maltasique et invertasique ; celles du pic sorti à pH 4,4 une forte activité tréhalasique, nous n'y avons décelé aucune autre activité osidasique. Les fractions correspondant à la dernière élution sont rassemblées et dialysées contre de l'eau distillée à $+4^{\circ}\text{C}$.

2) Propriétés de l'enzyme purifié.

pH optimum et Km.

Ils ont été mesurés sur une préparation purifiée renfermant 15 μg de protéines par ml ; après incubation de 120 min à 37°C (nous avons vérifié que ces conditions correspondent à celles de la vitesse initiale (Figure 1).

La tréhalase présente un pH optimum de 6,25 voisin de celui de 6,5 trouvé par ZANOZI sur l'extrait brut mais la courbe est beaucoup moins étalée.

Le Km est égal à $6 \times 10^{-4} \text{ M}$. (Fig. 2 a et 2 b).

TABEAU.

Purification de la tréhalase par précipitation au sulfate d'ammonium suivie de chromatographie sur alumine.

	Activité spécifique	Rendement	Purification
Extrait brut.....	0,019		
Précipité 0-70 p. 100	0,061	54,6 p. 100	3,21
Eluat	0,304	30,8 p. 100	6,4

Rendement final : 16,8 p. 100.

Purification finale : 20,4 fois.

Stabilité de l'enzyme.

L'enzyme purifié est très peu stable. L'activité de l'éluat diminue progressivement par séjour à la glacière jusqu'à devenir nulle après 5 jours. L'enzyme ne résiste pas à la congélation suivie de la décongélation. Pour conserver son activité nous avons fait différents essais de lyophilisation.

Nous avons réparti la solution enzymatique par fractions de 15 ml dans des flacons de 25 ml afin de lyophiliser sans chauffer et d'éviter toute altération par la chaleur. Lorsque l'éluat est lyophilisé après dialyse contre de l'eau distillée, il perd entièrement son activité. Nous avons obtenu la meilleure conservation de l'activité en dialysant à $+4^{\circ}\text{C}$, d'abord pendant 12 heures contre de l'eau distillée, puis pendant 12 heures contre un tampon de Mc Ilvaine de pH 6,25 dilué au 1/5 (0,04 M) et en lyophilisant aussitôt après. L'enzyme lyophilisé et conservé à l'abri de l'humidité est très stable. En quatre ans, il n'a subi aucune baisse d'activité. Il se comporte comme l'enzyme non lyophilisé. Il a le même K_m et le même pH optimum après dialyse contre de l'eau distillée.

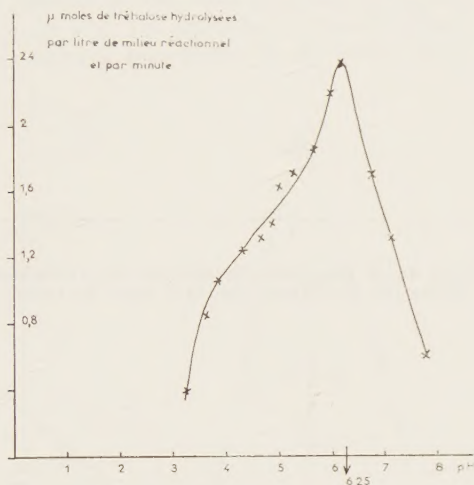


FIG. 1. — Influence du pH sur l'activité de la tréhalase (les conditions opératoires figurent dans le texte).

Influence de la température sur la vitesse de réaction.

Nous avons mesuré l'activité hydrolytique à différentes températures. Nous avons utilisé la représentation d'ARRHENIUS pour évaluer l'énergie d'activation en déterminant la vitesse de réaction dans les conditions standard du dosage à plusieurs températures. Elle est égale à 16,48 Kcal/mole entre 0 et 42°C . Dans les conditions de l'essai, l'enzyme est rapidement inactivé à des températures supérieures à 42°C avec une énergie d'inactivation égale à 14,74 Kcal/mole (Fig. 3 a et 3 b).

Pureté. Détermination approximative de la masse moléculaire.

La fragilité de l'enzyme ne nous permet pas de le concentrer de façon à obtenir une solution renfermant 1 mg de protéine par ml. Dans ces conditions, il est impossible de faire une ultracentrifugation et nous avons fait une détermination approximative du poids moléculaire par chromatographie de l'enzyme lyophilisé sur colonne de Sephadex G 200.

Nous avons opéré avec une colonne de 2 m de haut, 10 mm de diamètre en tampon tris 0,1 M pH 6,5 (pH obtenu par addition de HCl) et NaCl M. Nous avons introduit sur la colonne le contenu d'un flacon d'enzyme lyophilisé (renfermant 780 μ g de protéines) dissous dans 2 ml d'eau distillée, le volume mort de la colonne a été mesuré au bleu Dextran. Le volume

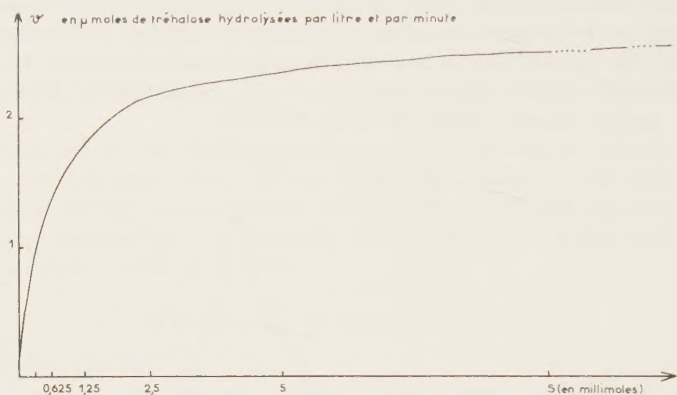


FIG. 2 a. — Cinétique de la réaction d'hydrolyse du tréhalose par la tréhalase (selon les conditions figurant dans le texte).

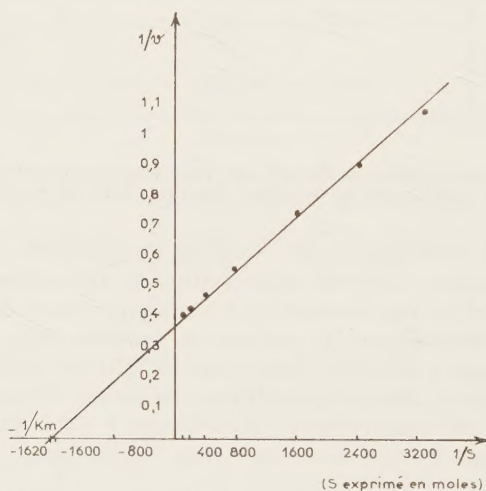


FIG. 2 b. — Détermination de K_m : représentation suivant LINEWEAVER et BURK [21] (selon les conditions figurant dans le texte).

d'élution de la tréhalase correspond à un poids moléculaire de 107 000 avec une précision de $\pm 5\,000$. Cette méthode présente l'inconvénient d'indiquer éventuellement le poids moléculaire d'un dimère ou d'un polymère

de l'enzyme au lieu de celui du monomère. Toutefois comme nous avons opéré en milieu tamponné fortement concentré avec NaCl *M* nous estimons que, dans ces conditions la formation de dimères est plus difficile.

A la sortie de colonne, nous avons mesuré dans chaque tube l'activité de la tréhalase et la teneur en protéines. Nous avons pu ainsi constater que l'activité spécifique était constante, ce qui est en faveur de l'existence d'une seule tréhalase.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Nous avons effectué une électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivant la méthode dite de « disc electrophoresis » avec l'appareil Canalco n° 6. Nous avons opéré avec le gel standard en tampon tris-glycine de pH 8,9 sous une tension de 200 volts pendant 45 mn, avec un courant de 5 mA par tube, à + 4°C. Un gel témoin fixé et coloré nous a révélé la présence de deux bandes très nettes et de traces d'une troisième. Nous

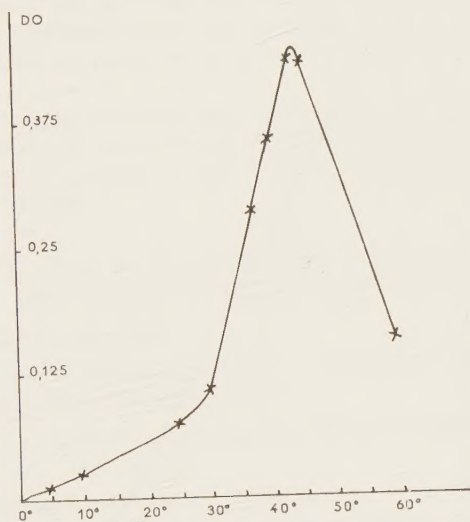


FIG. 3 a. — Vitesse d'hydrolyse à différentes températures d'incubation (selon les conditions figurant dans le texte).

avons découpé les autres gels au niveau des bandes pour les extraire. Après extraction par l'eau distillée et ajustement du pH à 6,5 par HCl dilué, nous avons procédé à une mesure de l'activité enzymatique dans les conditions habituelles. Les deux bandes repérées renferment toutes les deux une forte activité enzymatique. Le reste du gel est totalement inactif.

Recherche de sucres dans la préparation d'enzyme.

Un certain nombre d'osidases renferment des quantités importantes de sucres. Nous avons recherché la présence éventuelle d'aldoses dans notre préparation d'enzyme purifiée par la méthode à l'orcinol utilisée dans le cas des glycoprotéines [22].

La sensibilité de la méthode nous aurait permis de déceler 1 seul reste d'hexose, soit 11 μg pour 6 mg de protéine mise en réaction. Le dosage a été négatif. Par conséquent, il ne s'agit pas d'une glycoprotéine.

La variation de K_m et de $\log V_{\max}$ en fonction du pH [23] donne un pK_1 à 5,8. A partir de pH 6,7 il semble y avoir dénaturation de l'enzyme.

D'après KOSHLAND, l'existence d'un pK aux environs de pH 5,8 correspond vraisemblablement à un groupement imidazole [24].

Etude de l'action des réactifs des protéines sur l'activité enzymatique.

L'activité enzymatique est la même en milieu tampon Mc Ilvaine 0,2 M qu'en milieu tris 0,1 M ou qu'en tampon acide maléique-maléate de lithium (obtenu de façon analogue au tampon acide maléique-maléate de sodium, en remplaçant la soude par l'hydroxyde de lithium).

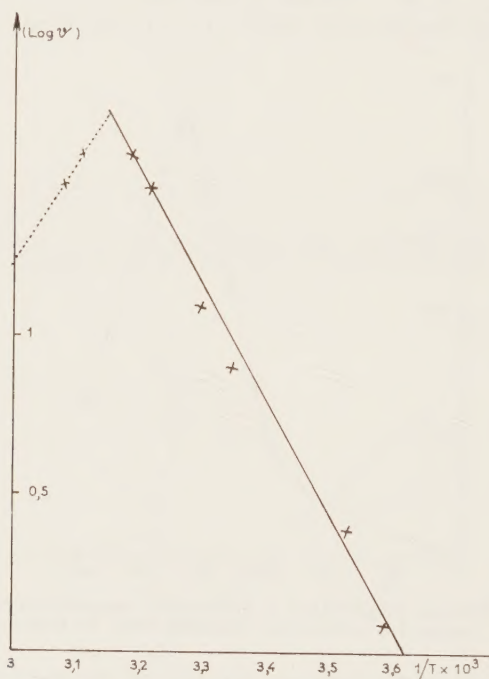


FIG. 3 b. — Détermination de l'énergie d'activation :
variation de $\log v$ en fonction de $1/T$
(selon les conditions figurant dans le texte).

Il n'y a donc aucune inhibition par les constituants de ces tampons. AVIGAD [5], cependant, observe une inhibition de la tréhalase de Levure à partir d'une concentration 0,1 M en tampon tris.

Pour nos essais d'inhibition, nous avons opéré avec une concentration en tréhalose dans le milieu plus grande que dans les conditions standard (0,064 M). Nous n'avons ajouté le tréhalose qu'après que l'enzyme ait été en contact une demi-heure avec l'inhibiteur.

a) *Inhibition par différents cations.*

La concentration finale en inhibiteur était de 1 mM. Dans ces conditions, nous n'avons constaté aucune inhibition par le Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , ni par le *Versène* (sel disodique de l'acide éthylènediaminetétracétique) neutralisé par l'ammoniaque. Zn^{2+} provoque une inhibition de 15 p. 100, Hg^{2+} ou Cu^{2+} une inhibition de 33 p. 100, Ag une inhibition de 70 p. 100.

b) *Action des réactifs des groupements thiols et des ponts disulfures.*

Nous avons dissous le p.chloromercuribenzoate de sodium dans un tampon de Mc Ilvaine pH 6,5 car le p.chloromercuribenzoate est pratiquement insoluble dans l'eau distillée et avons ajouté la même quantité de tampon dans les témoins. La tréhalase est totalement inactivée par une concentration 0,02 mM dans le milieu. Au contraire, l'iodoacétate de sodium à la concentration de 2 mM ou de 20 mM dans le milieu est sans action. La tréhalase exige donc la présence de groupements sulfhydryles libres pour exercer son activité. Par contre, étant donné que les thiols (cystéine, mercaptoéthanol) sont sans activité sur la protéine il ne semble pas que la présence de ponts disulfures soit essentielle à l'activité enzymatique.

Pour mieux connaître le rôle des acides aminés à groupements thiols, il faudrait évidemment pouvoir connaître la composition centésimale de la tréhalase en acides aminés, ce qui exige une assez grande quantité d'enzyme hautement purifié.

3) *Etude de la spécificité de la tréhalase.*
Recherche d'inhibiteurs spécifiques.

I. — *Spécificité du substrat.*

Par analogie avec le tréhalose qui est le substrat préférentiel nous avons essayé des corps à structure apparentée.

α -D-glucosides : méthyl- α -D-glucoside, phényl- α -D-glucoside, maltose, saccharose.

Nous avons fait agir une même concentration d'enzyme sur les substrats à la concentration 0,1 M et 0,01 M dans le milieu à pH 6,25 (tampon Mc Ilvaine 0,02 M) et à 37°C. Nous avons également fait agir la même concentration d'enzyme sur un mélange de tréhalose et du corps étudié aux mêmes concentrations afin de nous assurer qu'en même temps que le substrat éventuel nous n'introduisions pas un inhibiteur de la tréhalase dans le milieu.

Nous avons suivi la réaction, à la fois par chromatographie sur papier et par dosage du glucose libéré à des temps différents, jusqu'à ce que nous ayons 75 p. 100 d'hydrolyse du tréhalose témoin.

Aucun de ces corps n'a été hydrolysé par l'enzyme, ce qui nous laisse penser que la tréhalase ne se comporte pas comme une α -glucosidase à champ d'action étendu. Notons également qu'aucun de ces corps ne s'est révélé inhibiteur de la tréhalase et n'a pu servir d'accepteur du glucose

libéré par la tréhalase à partir du tréhalose. La chromatographie sur papier nous aurait permis de déceler la présence d'une trace de produit de transfert.

— *Oligosides.*

Raffinose, mélézitose. Comme on pouvait le prévoir d'après les résultats précédents, ces dérivés substitués du saccharose ne sont pas hydrolysés par la tréhalase.

— *β -glucosides.*

Cellobiose, β , β -tréhalose. Comme on pouvait s'y attendre l'enzyme s'est révélé inactif sur ces deux substances à liaison glucosidique β .

— *Dérivés non symétriques du tréhalose.*

Nous avons fait disparaître la symétrie de la molécule du tréhalose en préparant des dérivés de ce corps où la modification chimique n'a porté que sur un seul des résidus glucose [25] : α -D-galactosyl-(1 $\rightarrow$ 6) tréhalose, *O*-méthanesulfonyl-6 tréhalose, *O*-p. toluènesulfonyl-6 tréhalose, monoanhydro-3,6 tréhalose.

Deux autres produits nous ont été donnés : monophospho-6 tréhalose, céto-3 tréhalose (*).

Là encore, nos résultats ont été négatifs puisqu'aucun de ces dérivés n'a été hydrolysé par l'enzyme.

Nous avons été par ailleurs surpris de constater qu'aucune de ces substances qui restent des α -D-glucosides n'a été hydrolysée par une α -glucosidase que nous avons préparée à partir du rein de Rat [26].

Le cas du céto-3 tréhalose mérite d'être discuté : ce corps a été obtenu par FUKU et HOCHSTER [27] dans le milieu de culture d'une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* où le tréhalose était la seule source de carbone. Ces auteurs ont observé une hydrolyse du céto-3 tréhalose en glucose et céto-3 glucose sous l'influence d'une tréhalase partiellement purifiée extraite de *Rhizopus orizae*.

Nos expériences nous ont permis de constater que le céto-3 tréhalose est un corps instable qui s'hydrolyse très lentement en solution aqueuse et plus rapidement en milieu tampon à pH 6,25. Les quantités de glucose et de céto-3 glucose libérées en présence de tréhalase n'ont jamais été supérieures à celles libérées dans les témoins dépourvus d'enzyme.

L'ensemble de ces résultats nous permet donc de préciser la spécificité de la tréhalase. Il semble bien que non seulement la liaison (1 $\rightarrow$ α -1)- α , α soit nécessaire mais que de plus les hydroxyles en 3 et 6 doivent rester libres pour que la tréhalase puisse agir. On peut admettre que ces hydroxyles entrent en combinaison avec certains des groupes chimiques du site actif de la tréhalase.

Les osidases qui hydrolysent les hexosides sont pour la plupart capables d'hydrolyser les pentosides correspondants [28], par exemple la β -galactosidase hydrolyse les α -L-arabinosides (WALLÉN-FELS).

(*) Nous remercions MM. D. FRENCH et R. M. HOCHSTER qui nous ont aimablement fourni ces deux échantillons.

Nous avons voulu voir quel était le rôle de la configuration des groupes OH du substrat : ni l' α -D-xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3 - 1') α -D-xylopyranoside, ni l' α -D-xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3 - 1')- β -D-xylopyranoside [29], dont les hydroxyles en 2, 3 et 4 ont la même configuration que ceux du glucose, mais qui ne possèdent pas de CH_2OH fixé sur le carbone 5 ne sont hydrolysés. Il semble donc que la présence de ce groupe CH_2OH soit indispensable pour la réalisation de la combinaison enzyme-substrat.

En présence d'une solution concentrée de glucose (0,4 M), il n'y a pas formation de tréhalose même après plusieurs jours.

La tréhalase se distingue donc des autres glucosidases qui possèdent à la fois une activité hydrolysante et une activité transférante. Ceci est à rapprocher de la β -D-transfructosylase isolée par RAPOPORT [30] et dont l'activité se limite également à une hydrolyse.

II. — Spécificité de l'accepteur.

Comme nous l'avons déjà dit aucun des composés essayés comme substrat n'a servi d'accepteur au glucose libéré à partir du tréhalose. Nous n'avons pas non plus mis en évidence la formation de produits de transfert en faisant agir la tréhalase sur le tréhalose (0,01 M dans le milieu), en présence de méthanol (0,024 M), de xylose ou d'arabinose (0,1 M dans le milieu).

De façon à vérifier que du glucose introduit dans le milieu ne pouvait servir d'accepteur du glucose libéré à partir du tréhalose pour reconstituer le tréhalose, une expérience utilisant du glucose uniformément marqué au ^{14}C a été conduite de la façon suivante en incubant à 37°C :

0,1 ml solution tréhalose 0,05 M, 0,1 ml solution ^{14}C glucose (4,61 mCi/mM) 0,05 M, 0,05 ml enzyme (50 μg protéine/ml) en milieu tampon Mc Ilvaine, 0,2 M pH 6,25.

Nous avons effectué des prélèvements (50 μ litres soit 1 micromole, ou 4,61 microcuries) après 15 mn, 1 h, 2 h, 6 h, 24 h d'incubation à 37°C et séparé les composés formés par chromatographie sur papier Schleicher et Schull 2043 B Mg 1 dans le solvant *n*-butanol pyridine eau (9 : 5 : 4) (v : v).

Nous avons ensuite laissé le chromatogramme en contact avec un film sensible (Kodirex) sous presse pendant huit jours.

Après révélation et fixation du film, nous n'avons observé aucune formation de tréhalose marqué ni d'un autre produit de transfert. La sensibilité de la méthode nous aurait permis de déceler un transfert de 1 p. 100.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par DAHLQVIST [1], dans le cas de la tréhalase d'intestin de porc, et par AVIGAD, ZIV et NEUFELD [5] dans le cas d'une tréhalase de levure.

III. — Essais d'inhibition.

Les composés synthétiques voisins du tréhalose ne sont pas inhibiteurs de la tréhalase comme nous l'avons constaté en les essayant comme substrats.

Le tréhalose à forte concentration n'est pas inhibiteur (voir courbe représentation de v en fonction de s).

Nous avons essayé également différents composés : glucose, α -méthylglucoside, saccharose, cellobiose, D (—) arabinose, D (+) xylose, myoinositol, d'une part, à des doses croissantes en présence d'une même quantité d'enzyme (6 μ g de protéine par ml dans le milieu réactionnel) et de substrat (tréhalose 0,01 M dans le milieu), d'autre part, à deux concentrations différentes (0,001 et 0,002 M) en présence de la même quantité d'enzyme et de tréhalose à des concentrations variables (allant de 0,005 M à 0,000625 M), nous n'avons constaté aucune inhibition.

Le cas du glucose, corps formé dans la réaction d'hydrolyse du tréhalose est particulièrement intéressant, il n'y a donc aucune limitation de la réaction d'hydrolyse. SAÏRO (tréhalase du ver à soie *Bombyx mori*) et FRIEDMAN (fourmi royale : *Phormia regina*) ont eu les mêmes résultats négatifs. AVIGAD et coll., par contre, ont trouvé que la tréhalase d'une Levure hybride était inhibée par le glucose mais qu'il s'agissait d'une inhibition de type non compétitif.

Essais d'inhibition par des substances qui peuvent avoir un rôle régulateur dans le métabolisme.

Chez les Insectes, le tréhalase sert de source d'énergie en particulier lors du vol [31, 32]. Le glucose libéré doit alors suivre la voie glycolytique d'EMBDEN-MEYERHOF.

Il nous a donc paru intéressant de voir s'il n'y avait pas, soit une activation, soit une inhibition de la tréhalase par l'un des corps formés lors de la glycolyse ou par des dérivés phosphorylés de l'adénosine.

Tous les corps utilisés sont des produits commerciaux des Etablissements Calbiochem (nous en avons vérifié la pureté par chromatographie).

Corps formés lors de la glycolyse.

Glucose-6 phosphate (sel disodique), glucose-1 phosphate (sel dipotassique, dihydraté), fructose-1,6 diphosphate (sel trisodique), phosphoénolpyruvate (sel trisodique), lactate de lithium.

Nous avons également étudié une série de *dérivés phosphorylés de l'adénosine* : adénosine monophosphate-5' (AMP) monohydrate, adénosine mono-phosphate cyclique-3'5', adénosine diphosphate (ADP) dihydrate, adénosine triphosphate (ATP) trihydrate.

La plupart de ces composés ont une réaction fortement acide en solution aqueuse.

Pour nos essais, nous avons ajusté le pH à 6,25 avec NaOH 0,1 M à l'aide d'un potentiographe Metrohm E 336. La concentration du milieu réactionnel était 0,01 M et 0,001 M en inhibiteur.

Nous n'avons constaté aucune inhibition après 30 mn, 1 h, 2 h et 6 h d'incubation à 37°C.

COURTOIS et coll. [33] ont obtenu une inhibition de la tréhalase du rein de Porc avec le phloridzozide. Le phloridzozide ou phlorétine-2'- β -D-glucoside ($C_{21}H_{21}O_{10}$) a une action inhibitrice sur la phosphorylase muscu-

laire et sur la réabsorption tubulaire rénale du glucose. Il est très peu soluble dans l'eau. Nous l'avons employé aux concentrations M/1 000 et M/250 dans le milieu. A ces concentrations, nous n'avons observé aucune inhibition. L'ouabaïne qui agit sur le transport actif du sodium et a indirectement une action inhibitrice sur l'assimilation du glucose n'a aucun effet inhibiteur sur la tréhalase.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

L'étude de la spécificité de la tréhalase vis-à-vis de différents substrats et les essais d'inhibition de cette même tréhalase nous ont conduits à plusieurs résultats intéressants.

1) Etude de la spécificité.

1) La tréhalase n'hydrolyse pas le β , β -tréhalose. La liaison osidique doit donc être α , α ou tout au moins α , β .

2) Nécessité d'un groupement alcool primaire non substitué en C₆. Nous avons effectué toutes nos expériences sur des dérivés monosubstitués en C₆. Aucun de ceux-ci n'a été hydrolysé. On peut objecter que dans le cas de l' α -D-galactosyl-(1 $\rightarrow$ 6) tréhalose, l'introduction d'un reste α -D-galactosyle provoque un encombrement stérique, mais dans le cas du monophosphotréhalose, le remplacement d'un hydroxyle par un atome de phosphore n'introduit qu'un faible changement dans la molécule.

3) Le fait que la tréhalase n'hydrolyse pas l' α -D-xylopyranosyl- α -D-xylopyranoside confirme qu'au moins un CH₂OH en C₆ est nécessaire et qu'il ne suffit pas que la molécule soit symétrique pour que l'enzyme puisse agir.

4) L'importance de l'hydrolyse en 3 est prouvée par le fait que le céto-3 tréhalose n'est pas hydrolysé. Le remplacement d'un hydroxyle par une fonction cétonique introduit dans la molécule une modification plus importante qu'une inversion d'hydroxyle.

Les résultats que nous avons obtenus prouvent néanmoins que la tréhalase a une spécificité très restreinte, ce qui laisse supposer que le site enzymatique est très étroitement adapté au tréhalose.

Jusqu'à présent, toutes les tréhalases étudiées après purification n'ont montré vis-à-vis du tréhalose qu'une activité hydrolysante sans qu'on ait pu mettre en évidence de transfert du reste α -D-glucopyranosyle et elles n'ont également hydrolysé que le seul tréhalose.

Le fait qu'il n'y a pas d'inhibition par les dérivés dissymétriques du tréhalose précédemment étudiés comme substrats, indique qu'il n'y a pas fixation sur le site enzymatique.

La destruction de la symétrie de la molécule de tréhalose entraîne donc une perte de possibilité de fixation sur la tréhalase et il n'y a ni hydrolyse, ni inhibition par le dérivé.

Seule parmi les enzymes bien étudiées jusqu'à présent, l'uréase nous paraît avoir une spécificité aussi absolue : on ne lui connaît pas d'autre substrat que l'urée (une centaine de dérivés ont été essayés par SÜMNER [34]), son activité paraît limitée à l'hydrolyse et les produits d'hydrolyse ne sont pas inhibiteurs de l'uréase.

II) Essai d'inhibition.

La tréhalase que nous avons isolée puis étudiée n'est activée ou inhibée ni par les corps formés lors de la glycolyse ni par les dérivés phosphorylés de l'adénosine.

Il peut cependant en être autrement chez l'Insecte : la tréhalase peut y être présente sous forme d'un dimère ou d'un polymère et être activée ou inhibée sous cette forme.

En effet, on peut envisager au moins deux mécanismes différents régulateurs du taux de tréhalase chez l'Insecte.

1) Un mécanisme lent qui maintient un taux constant dans l'hémolymphe. Il pourrait être analogue à celui envisagé par MURPHY et WYATT [35] dans le cas d'*Hyalophora cecropia*. Lorsque le taux de tréhalose est suffisamment élevé, il y a inhibition de la tréhalose-synthétase et il se forme préférentiellement du glycogène.

Chez le ver à soie *Bombyx mori*, DUCHATEAU-BOSSON, JEUNIAUX et FLORKIN [36] ont montré qu'il y avait une relation constante entre le taux de glycogène de l'organe dénommé corps adipeux chez l'insecte et du tréhalose sanguin.

2) Mais ce mécanisme peut difficilement intervenir s'il est vrai que le tréhalase sert de source d'énergie lors du vol ou lors de la mue des vers à soie. Il faut une hydrolyse rapide du tréhalose et l'activation ou la levée d'inhibition de la tréhalase doit être instantanée. Chez *Bombyx mori*, le tréhalose sanguin revient rapidement à la normale après qu'on l'ait modifié expérimentalement (SAÏTO) [37].

Nous avons vérifié la présence de tréhalose chez le Hanneton. Après avoir broyé 100 g de hannetons dans 500 ml d'eau distillée, centrifugé le tout à 6 000 tours minute et dialysé le surnageant à + 4°C contre deux litres d'eau distillée, nous avons évaporé à sec sous pression réduite la fraction dialysable contenue dans le bac de dialyse. Le résidu a été repris par de l'eau distillée, décoloré au noir animal et étudié avec quatre mélanges solvants différents : *n*-butanol/pyridine/eau (9 : 5 : 4) (v : v) ; isopropanol/*n*-butanol/eau (7 : 1 : 2) (v : v) ; acétate d'éthyle/pyridine/eau (30 : 12 : 9) (v : v) ; acétate d'éthyle *n*-butanol/acide acétique/eau (3 : 4 : 2,5 : 4) (v : v). Cette chromatographie nous a permis de mettre en évidence la présence de trois composés révélables par le nitrate d'argent, un seul est réducteur et révélé par le réactif au thymol et à la β -naphtylamine. Les Rf de deux de ces corps sont identiques à ceux du glucose et du tréhalose témoins.

Nous avons confirmé l'existence du tréhalose dans l'extrait en faisant des chromatographies sur papier épais, et en extrayant le corps migrant

comme le tréhalose témoin. Par acétylation, nous obtenons un dérivé qui cristallise en longues aiguilles, fond à 76-78°C et a le même Rf que l'octa-O-acétyltréhalose sur plaques de gel de silice avec le solvant benzène/méthanol (96 : 4) (v : v). Le troisième constituant de l'extrait donne la réaction spécifique de l'inositol : en pulvérisant sur le chromatogramme successivement du réactif de MEILLERE [38] dilué au 1/3 (deux pulvérisations séparées par un chauffage à 90°C), puis une solution d'acétate de baryum dans l'acide acétique (quatre pulvérisations, séparées également par un chauffage à 90°C) suivant le protocole décrit par MALANGEAU [39] : on obtient une tache rose orangé du même Rf qu'un échantillon d'inositol.

HANSEN [40] pense qu'il faut être prudent et ne pas conclure à la présence de tréhalose chez l'insecte par simple chromatographie avec le système de WYATT et KALF [31], car le maltose et le cellobiose possèdent des Rf voisins de celui du tréhalose. HANSEN a isolé et cristallisé du maltose à partir du sang de criquets : *Locusta migratoria migratorioides* et *Schistocerca gregaria*, alors que HOWDEN et KILBY, après chromatographie des glucides du sang de *Schistocerca gregaria*, pensaient que le principal sucre de cet insecte était du tréhalose [41].

Dans le cas du Hanneton, nous avons employé des systèmes chromatographiques où les Rf du maltose et du cellobiose sont très différents de celui du tréhalose. En outre, l'isolement du tréhalose sous forme d'octa-O-acétyltréhalose ne laisse aucun doute sur la nature du disaccharide trouvé.

Il semble donc que chez cet insecte il y ait un rapport entre le fait que les seuls sucres trouvés soient le glucose et le tréhalose et que l'activité tréhalasique soit très forte.

FRIEDMAN [6, 42] a démontré la présence simultanée dans le sang de *Phormia regina* Meig de tréhalose, de tréhalase, et d'un inhibiteur de la tréhalase. L'inhibiteur est bien plus labile que la tréhalase et peut être détruit par chauffage à 60°C.

D'après les résultats des expériences de FRIEDMAN, il semble qu'au moins deux facteurs soient responsables de l'inhibition : une grosse molécule probablement protéique et un ion métallique, vraisemblablement un cation bivalent du groupe de Mg^{++} . Il reste à voir si cet inhibiteur joue un rôle actif dans le métabolisme du tréhalose. FRIEDMAN n'a pas pu mettre en évidence une levée d'inhibition par des prélèvements de sang lors du vol, mais il considère que les techniques de dosage ne peuvent permettre de déceler une hydrolyse du tréhalose si celle-ci est localisée.

De même, DUCHATEAU-BOSSON, JEUNIAUX et FLORKIN pensent que chez le ver à soie, la tréhalase de l'hémolymph est inhibée par un inhibiteur inconnu et qu'il y a levée de cette inhibition lors de la mue.

3) Un troisième mécanisme pourrait également intervenir : l'enzyme particulière du muscle alaire de *Cecropia* (GUSSIN et WYATT [43]) peut être *in vitro* libéré par des congélations et des décongélations successives ou par addition d'acide oléique à un homogénat. *In vivo*, il se pourrait donc qu'il y ait une activation physique de la tréhalase.

Avant de conclure à l'absence d'inhibiteur de la tréhalase chez le Haneton, il faudrait vérifier par des techniques convenables si, après excitation du muscle *in vitro*, on obtient une augmentation de l'activité de la tréhalase.

SUMMARY.

The authors describe the purification of a trehalase from may-bug, by precipitation with ammonium sulfate, and chromatography on an alumina column. After lyophilisation in buffer medium (pH 6,5) no loss in enzymatic activity was observed. The enzyme (M.W. about 100 000) needs free thiol groups to ensure activity ; optimum pH is 6,25, and $K_m = 6.10^{-4}$ M at 37°C.

This trehalase does not act as an α glucosidase : it hydrolyzes neither the α -D glucosides, the xylopyranosyl ($1 \rightarrow 6$) xylopyranosides, nor asymetric trehalose derivatives. The only specific substrate seems to be α, α -trehalose, and the hydroxyls in 3 and 6 positions of the disaccharide must be non substituted to ensure the hydrolytic activity of the enzyme.

No inhibition occurred with metabolites of the glycolytic chain, or with phosphoryl derivatives of adenosine, and inhibition by some cations was studied. No transferring activity of trehalase could be observed.

ZUSAMMENFASSUNG.

Aus einem Extrakt von Maikäfer haben die Verfasser die Reinigung einer Trehalase durch fraktionierte Fällung mittels Ammoniumsulfat (0-70 p. 100), und durch darauffolgende Chromatographie an einer Aluminssäule durchgeführt. Die Stabilisation des Enzyms wird gleich nach der Elution aus der Säule durch Lyophilisation im gepufferten Medium erzielt. Diese Trehalase, deren Molekulargewicht in der Nähe von 100 000 liegt, ist kein Glycoprotein und die biologische Aktivität erfordert das Vorhandensein von mindestens einer SH-Gruppe im enzymatischen Protein.

Das Optimum-pH ist 6,25 und bei diesem pH und bei 37° ist das $K_m = 6.10^{-4}$ M.

Die Trehalase verhält sich nicht wie eine übliche α -Glucosidase, denn sie hydrolysiert weder die α -D-Glucoside, noch die Xylopyranosyl- ($1 \rightarrow 6$) Xylopyranoside, noch die unsymmetrischen Derivate der Trehalose. Ihr einziges spezifisches Substrat scheint die α, α -Trehalose zu sein und die Hydroxyle in 3- und 6-Stellung sind für die hydrolysierende Wirkung der Trehalase unentbehrlich.

Sie wird weder durch die Metabolite der Glykolyse-Kette noch durch die Phosphorderivate des Adenosins inhibiert.

Die inhibierende Wirkung verschiedener Kationen ist untersucht worden und keine transferierende Aktivität dieser Trehalase konnte nachgewiesen werden.

BIBLIOGRAPHIE.

1. DAHLQUIST, A. — *Acta chem. Scand.*, 1960, 14, 9.
2. COURTOIS, J. E., PETEK, F. et KOLAH-ZANOZI, M. A. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1962, 44, 735.
3. HILL, E. P. et SUSSMAN, A. S. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, 102, 389.
4. PANEK, A. et SOUZA, N. O. — *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 1671.
5. AVIGAD, G., ZIV, O. et NEUFELD, E. — *Biochem. J.*, 1965, 97, 715.
6. FRIEDMAN, S. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, 87, 252.
7. SAITO, S. — *J. Biochem. (Japon)*, 1960, 48, 101.
8. KALF, G. F. et RIEDER, S. V. — *J. Biol. Chem.*, 1958, 230, 691.
9. LUKOMSKAJA, I. S. et TARASOVA, G. I. — *Biokhimiya*, 1965, 30, n° 1, 95.

10. HELFERICH, B. et SCHMITZ-HILLEBRECHT, E. — *Ber.*, 1933, **66**, 378.
11. HELFERICH, B. — *Ber.*, 1944, **77**, 194.
12. MONTGOMERY, E., RICHTMYER, N. K. et HUDSON, C. S. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1942, **64**, 690.
13. HUDSON, C. S. et DALE, J. K. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1915, **37**, 1280.
14. HELFERICH, B. et WINKLER, S. — *Ber.*, 1933, **66**, 1556.
15. ZEMPLEN, G. et PACSU, E. — *Ber.*, 1929, **62**, 1613.
16. NELSON, N. — *J. Biol. Chem.*, 1944, **153**, 375.
17. SOMOGYI, M. — *J. Biol. Chem.*, 1945, **160**, 69.
18. LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L. et RANDALL, R. J. — *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.
19. PETEK, F. et DONG, T. — *Enzymologia*, 1961, **23**, 133.
20. KOLAH-ZANOUZI, M. A. — Th. Doct. Univ. Pharm. Paris, 1962.
21. LINEWEAVER, H. et BURK, D. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1934, **56**, 658.
22. FRANÇOIS, C., MARSHALL, R. D. et NEUBERGER, A. — *Biochem. J.*, 1962, **83**, 335.
23. DIXON, M. — *Biochem. J.*, 1953, **55**, 161.
24. KOSHLAND Jr., D. E. — *Adv. Enzym.*, 1960, **22**, 45.
25. GUILLOUX, E. et PERCHERON, F. — *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1968, **266 C**, 153.
26. GUILLOUX, E. — Th. Doct. Etat Sciences, Orsay, 1968.
27. FUKUI, S. et HOCHSTER, R. M. — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1963, **41**, 2363.
28. WALLENFELS, K. et MALHOTRA, O. P. — in Myrbäck, K., 2^e éd., 1960, **4**, 409, Acad. Press, éd., N.Y.
29. HELFERICH, B. et OST, W. — *Chem. Ber.*, 1962, **95**, 2616.
30. RAPOPORT, G. — Th. Doct. Etat Sciences, Paris, 1966.
31. WYATT, G. R. et KALF, G. F. — *J. Gen. Physiol.*, 1957, **40**, 833.
32. CLEGG, J. S. et EVANS, D. R. — *J. Exptl. Biol.*, 1961, **38**, 771.
33. COURTOIS, J. E., DEMELIER, J. F., LABAT, J. et HARGREAVES, F. — *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1968, **266 D**, 956.
34. SUMNER, J. B. — « The Enzymes », 1^{re} édition, 1951, vol. 1, p. 886.
35. MURPHY, T. A. et WYATT, G. R. — *J. Biol. Chem.*, 1965, **240**, 1500.
36. DUCHÂTEAU-BOSSON, Gh., JEUNIAUX, Ch. et FLORKIN, M. — *Arch. Intern. physiol. et Biochim.*, 1963, **71**, 566.
37. SAITO, S. — *J. Insect. Physiol.*, 1963, **9**, 509.
38. MEILLERE, G. — *C. R. Soc. Biol.*, 1906, **60**, 226.
39. MALANGEAU, P. — Th. Doct. Etat Pharm., Paris, 1956.
40. HANSEN, O. — *Biochem. J.*, 1964, **92**, 333.
41. HOWDEN, G. F. et KILBY, B. A. — *Chem. and Ind.*, 1956, 1453.
42. FRIEDMAN, S. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, **93**, 550.
43. GUSSIN, A. E. S. et WYATT, G. R. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1965, **112**, 626.



